

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

PCT/JP 00/00095  
9/869949

12.01.00

REC'D 03 MAR 2000

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年 1月12日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第005420号

出願人

Applicant(s):

西田 輝夫  
参天製薬株式会社

PRIORITY

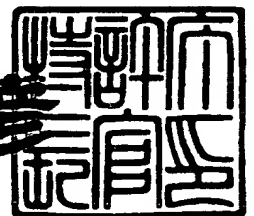
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 2月18日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3006955

【書類名】 特許願

【整理番号】 P990008

【提出日】 平成11年 1月12日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 31/66

【発明の名称】 角膜障害治療剤

【請求項の数】 5

【発明者】

    【住所又は居所】 山口県宇部市大字西岐波 3 9 6 番地の 2

    【氏名】 西田 輝夫

【発明者】

    【住所又は居所】 奈良県桜井市大字箸中 5 3 1 番地の 1

    【氏名】 中田 勝彦

【発明者】

    【住所又は居所】 奈良県奈良市三松 2 丁目 1 2 番 3 - 2 0 5 号

    【氏名】 中村 雅胤

【特許出願人】

    【住所又は居所】 山口県宇部市大字西岐波 3 9 6 番地の 2

    【氏名又は名称】 西田 輝夫

【特許出願人】

    【識別番号】 000177634

    【氏名又は名称】 参天製薬株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100060874

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 岸本 瑛之助

【選任した代理人】

    【識別番号】 100024418

    【弁理士】

【氏名又は名称】 岸本 守一

【選任した代理人】

【識別番号】 100079038

【弁理士】

【氏名又は名称】 渡邊 彰

【選任した代理人】

【識別番号】 100083149

【弁理士】

【氏名又は名称】 日比 紀彦

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 002820

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 角膜障害治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 R h o 活性化作用を有する化合物を有効成分とする角膜障害治療剤。

【請求項 2】 R h o 活性化作用を有する化合物がリゾホスファチジン酸またはそのアシル誘導体である請求項 1 記載の角膜障害治療剤。

【請求項 3】 リゾホスファチジン酸のアシル誘導体がオレオイルリゾホスファチジン酸である請求項 2 記載の角膜障害治療剤。

【請求項 4】 角膜障害が角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎またはドライアイである請求項 1 から請求項 3 のいずれかに記載の角膜障害治療剤。

【請求項 5】 R h o 活性化作用を有する化合物を有効成分とする角膜上皮伸展促進剤。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明はリゾホスファチジン酸またはそのアシル誘導体等の R h o 活性化作用を有する化合物を有効成分とした、角膜上皮伸展の促進作用を有する角膜障害治療剤に関するものである。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

角膜は直径約 1 c m、厚さ約 1 m m の透明な無血管の組織である。角膜の透明性は視機能に重要な影響を与えており、角膜における種々の生理生化学的現象は、主として角膜の透明性の維持ということを目的として機能している。

【0 0 0 3】

角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎またはドライアイ等の種々の疾患により引き起こされた角膜上皮欠損は、混合感染の併発がなければ自然に修復する。しかし、何らかの理由で修復が遅延したりあるいは修復が行われずに上皮欠損が遷延化

すると、上皮の正常な構築に悪影響を与えるのみならず、実質や内皮の構造や機能まで害される。従来からの治療法の原理は、外界の刺激から角膜表面を保護することにより自然に上皮が伸展して欠損部の再被覆をはかるという受動的なものである。近年、細胞生物学の発展に伴い、細胞の分裂・移動・接着・伸展等に関する因子が解明されており、角膜上皮欠損の修復には、角膜上皮の伸展を促進する化合物が重要な役割を担うことが報告されている（臨眼, 46, 738-743 (1992)、眼科手術, 5, 719-727 (1992))。

#### 【0004】

ところで、細胞は外界シグナルに応答して、細胞骨格や細胞接装置をダイナミックに変化させて外界環境に適応させる。細胞骨格を形成する主要構成成分は、アクチン等からなるマイクロフィラメント、チューブリン等からなる微小管、ケラチン等からなる中間径フィラメントの3種類の線維構造である。これらは互いに密接に関係しながら、細胞接着、細胞形態、細胞質分裂、細胞の極性形成等の高次機能を担っている。

#### 【0005】

このうち、アクチン-マイクロフィラメント系の細胞骨格を制御していると考えられているのが、低分子量GTP結合タンパクのサブファミリーの1つであるRhoファミリーである。Rhoファミリーは、Rho、Rac、Cdc42等のメンバーから構成されており、細胞増殖因子等の細胞外シグナルの下流で作用している。最近、Rhoに特異的な標的タンパクが同定され、細胞骨格と接着の制御機構（実験医学, 16, 1782-1788 (1998))や細胞運動の制御機構（実験医学, 16, 2032-2039 (1998))等、細胞現象の制御メカニズムが明らかにされつつある。

#### 【0006】

一方、Rhoを特異的に活性化させる化合物としてリゾホスファチジン酸またはそのアシル誘導体が知られている（Cell, 70, 389-399 (1992))。リゾホスファチジン酸またはそのアシル誘導体についてはさまざまな作用が報告されている。例えば、細胞とフィブロネクチンの結合を促進して細胞形態を調節すること（J. Cell Biol., 127, 1447-1459 (1994))、皮膚創傷時におけるフィブロネクチ

ンの上皮細胞および内皮細胞への結合を促進すること（アメリカ特許5480877号明細書）、グリコサミノグリカン産生促進作用を有する皮膚活性化剤であり、化粧品および皮膚老化防止外用剤として有用であること（国際特許公開WO95/35090号公報）、乾癬などで生じる上皮細胞の過増殖を抑制すること（アメリカ特許5565439号明細書）、マクロファージを活性化し腫瘍における細胞壊死を抑制すること（アメリカ特許5149527号明細書）、アポトーシスを阻害し細胞の機能を維持または回復すること（国際特許公開WO98/41213号公報）等がある。

#### 【0007】

眼科領域においては、網膜色素上皮細胞の増殖を促進すること（Curr. Eye Res., 16, 698-702 (1997)）、培養水晶体上皮細胞においてCa<sup>2+</sup>イオンの流入を促進すること（Cell. Signal., 9, 609-616 (1997)）、角膜障害時に房水中のリゾホスファチジン酸またはそのアシル誘導体の量が増加することおよび正常な角膜実質細胞の増殖を促進すること（Am. J. Physiol., 274, C1065-C1074 (1998)）等が報告されている。

#### 【0008】

しかしながら、Rhoと角膜上皮細胞との関係については報告されておらず、角膜上皮欠損の修復と深い関係がある角膜上皮の移動機構に対するRho活性化作用を有する化合物の効果は無論知られていない。

#### 【0009】

##### 【発明が解決しようとする課題】

上記のように、細胞現象の制御メカニズムに関与する低分子量GTP結合タンパクであるRhoの角膜上皮の移動機構への関与の研究を通じて、Rho活性化作用を有する化合物の角膜障害に対する作用、特に角膜上皮伸展に対する作用を調べることは非常に興味ある課題であった。

#### 【0010】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者等はRhoの角膜上皮の移動機構への関与を検討するために、まずRho阻害剤の角膜上皮に及ぼす影響を検討した。その結果、Rho阻害剤によっ

て角膜上皮の伸展は完全に抑制され、角膜上皮の移動機構には低分子量GTP結合タンパクであるRhοによる細胞内骨格系タンパクの制御が関与していることが明らかとなった。

【0011】

次に、Rhο活性化作用を有する化合物の角膜上皮に対する効果を検討したところ、優れた角膜上皮伸展に対する促進作用を有することを見いだした。

【0012】

さらに、Rhο活性化作用を有する化合物とRhο阻害剤を併用したところ、上記の角膜上皮伸展の促進はほぼ完全に抑制され、角膜上皮伸展に対する促進作用は、Rhο活性化作用に基づくものであることが確認された。

【0013】

以上のことから、Rhο活性化作用を有する化合物が優れた角膜上皮伸展促進作用を有し、種々の要因により角膜が損傷を受けた状態にある角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎またはドライアイ等の角膜障害の治療剤として有用であることが明らかとなった。

【0014】

【発明の実施の形態】

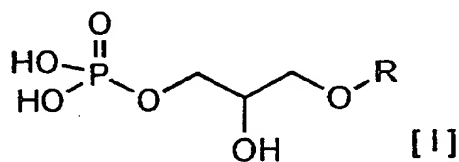
本発明におけるRhο活性化作用を有する化合物とは、Rhοが関与している細胞現象の制御メカニズムを亢進させる化合物を示す。

【0015】

本発明におけるリゾホスファチジン酸またはそのアシル誘導体とは下記一般式[I]で表わされる化合物を示す。

【0016】

【化1】



## 【0017】

[式中、Rは水素原子またはアシル基を示す。]

本発明におけるアシル基とは、飽和もしくは不飽和の脂肪族カルボニル基または芳香族カルボニル基を示すが、好ましくは飽和もしくは不飽和の脂肪族カルボニル基で、より好ましくは炭素数6以上の高級脂肪族カルボニル基で、特に好ましい例はオレオイル基およびステアロイル基である。

## 【0018】

本発明における角膜障害とは、種々の要因により角膜が損傷を受けた状態にある角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎、ドライアイ等をいう。

## 【0019】

Rh $\alpha$ の角膜上皮の移動機構への関与を検討すべく、Rh $\alpha$ 阻害剤ならびにRh $\alpha$ 活性化作用を有する化合物の角膜上皮に対する作用を検討した。詳細については後述の薬理試験の項で示すが、Rh $\alpha$ 阻害剤として知られているボツリヌス菌の菌体外酵素であるC3酵素（以下、Exoenzyme C3 とする）（Cell, 70, 389-399 (1992)）によって角膜上皮の伸展はほぼ完全に抑制されることを認めた。

## 【0020】

このことから、角膜上皮の移動機構には低分子量GTP結合タンパクであるRh $\alpha$ が関与していることが明らかとなった。

## 【0021】

次に、Rh $\alpha$ 活性化作用を有する化合物の代表的な化合物であるリゾホスファチジン酸またはそのアシル誘導体の角膜上皮伸展に対する効果を検討したところ、リゾホスファチジン酸またはそのアシル誘導体が角膜片の組織培養系における角膜上皮の伸展を促進することを見いだした。さらに、この角膜上皮伸展促進作用は Exoenzyme C3 によってほぼ完全に抑制されることが認められ、リゾホスファチジン酸またはそのアシル誘導体の有する角膜上皮伸展促進作用はRh $\alpha$ 活性化作用に基づくものであることが確認された。これらのことから、Rh $\alpha$ 活性化作用を有する化合物は、優れた角膜上皮伸展促進作用を有し、角膜障害、すなわち種々の要因により角膜が損傷を受けた状態にある角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角



膜炎、ドライアイ等の治療に有用であることが明らかとなった。

#### 【0022】

Rh<sub>o</sub>活性化作用を有する化合物は、経口でも、非経口でも投与することができる。投与剤型としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、注射剤、点眼剤等が挙げられ、特に点眼剤が好ましい。これらは汎用されている技術を用いて製剤化することができる。例えば、点眼剤は、塩化ナトリウム、濃グリセリン等の等張化剤、リン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム等の緩衝化剤、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート、ステアリン酸ポリオキシシル40、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油等の界面活性剤、クエン酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム等の安定化剤、塩化ベンザルコニウム、パラベン等の防腐剤等を必要に応じて用い調製することができる。pHは眼科製剤に許容される範囲内にあればよいが、4～8の範囲が好ましい。眼軟膏は、白色ワセリン、流動パラフィン等の汎用される基剤を用いて調製することができる。また、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤等の経口剤は、乳糖、結晶セルロース、デンプン、植物油等の増量剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン等の結合剤、カルボキシメチルセルロース カルシウム、低置換ヒドロキシプロピルメチルセルロース等の崩壊剤、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、マクロゴール、シリコン樹脂等のコーティング剤、ゼラチン皮膜等の皮膜剤などを必要に応じて加えて調製することができる。

#### 【0023】

投与量は症状、年齢、剤型等によって適宜選択できるが、点眼剤であれば0.0001～1% (w/v)、好ましくは0.001～1% (w/v) のものを1日1～数回点眼すればよい。また、経口剤であれば通常1日当り0.1～5000mg、好ましくは1～1000mgを1回または数回に分けて投与すればよい。

#### 【0024】

以下に、製剤例および薬理試験の結果を示すが、これらの例は本発明をよりよく理解するためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

【0025】

【実施例】

〔製剤例〕

R h o 活性化作用を有する化合物としてオレオイル リゾホスファチジン酸（以下、オレオイル L P A という）を用いた代表的な製剤例を以下に示す。

【0026】

1. 点眼剤

以下の処方点眼剤を汎用される方法を用いて調製した。

【0027】

処方例 1（点眼液）

100ml 中

オレオイル L P A	1mg
塩化ナトリウム	900mg
水酸化ナトリウム	適量
塩酸	適量
滅菌精製水	適量

【0028】

処方例 1 と同様にして、必要に応じて界面活性剤や安定化剤を加えて、オレオイル L P A を 100ml 中 5mg、10mg、50mg、100mg、500mg、1000mg 含有する点眼液を調製することができる。

【0029】

処方例 2（眼軟膏）

100g 中

オレオイル L P A	100mg
白色ワセリン	90g
流動パラフィン	適量

【0030】

処方例 2 と同様にして、オレオイル L P A を 1mg、5mg、10mg、50mg 含有する眼軟膏を調製することができる。

【0031】

処方例 3 (錠剤)

100mg 中

オレオイル L P A	10 mg
乳糖	59.4 mg
トウモロコシデンプン	20 mg
カルボキシメチルセルロース カルシウム	6 mg
ヒドロキシプロピルセルロース	4 mg
ステアリン酸 マグネシウム	0.6 mg

【0032】

上記処方の錠剤に、ヒドロキシプロピルセルロース等のコーティング剤 2mg を用いてコーティングを施し、目的とするコーティング錠を得ることができる。

【0033】

処方例 3 と同様にして、オレオイル L P A を 100mg 中 0.1mg、0.5mg、1mg、5mg、50mg 含有する錠剤を得ることができる。

【0034】

[薬理試験]

角膜上皮伸展に対する作用 (in vitro)

雄性日本白色ウサギの角膜を用い、Nishida らの方法 (J. Cell Biol., 97, 1653-1657 (1983)) に準じ、角膜片の組織培養系での角膜上皮伸展長を指標にして角膜上皮伸展に対する下記被験化合物の影響を検討した。

【0035】

(実験方法)

ウサギ角膜片より切り出した角膜ブロックを、被験化合物を含む培養液 (TC-199) 中、37℃・5%CO<sub>2</sub> の条件下で 24 時間培養した。培養後、角膜ブロックをエタノール-氷酢酸 (容積比 95:5) 混合液中で固定し、パラフィンで包埋して切片を作製した。切片を脱パラフィンした後、ヘマトキシリン-エオジン染色し、顕微鏡下で上皮細胞層の伸展長を測定した。

【0036】

コントロールとしては被験化合物を含まない培養液で同様に培養したものを用いた。

【0037】

(結果1)

R h o 阻害剤である Exoenzyme C3 を被験化合物として含む培養液で培養したときの結果を表1に示す。

【0038】

【表1】

	伸展長 ( $\mu$ m )
コントロール	4 5 4
Exoenzyme C3 ( 2 $\mu$ g / m l )	1 8 6

(表中のデータは6例の平均値)

【0039】

表1から判るように、R h o 阻害剤である Exoenzyme C3 を含む培養液で培養をすると、角膜上皮の伸展はほぼ完全に抑制され、角膜上皮伸展に R h o が関与していることが明らかとなった。

【0040】

(結果2)

0. 0 2  $\mu$  M、0. 2  $\mu$  Mおよび2  $\mu$  Mの濃度のオレオイル L P A を被験化合物として含む培養液で培養したときの結果を表2に示す。

【0041】

【表2】

	伸展長 (μm)
コントロール	4 5 4
オレオイル L P A (0. 0 2 μM)	5 2 8
(0. 2 μM)	6 5 8
(2 μM)	7 1 2

(表中のデータは6例の平均値)

【0042】

表2から判るように、オレオイル L P A を含む培養液で培養をすると、角膜上皮の伸展が濃度依存的に顕著に促進されることが認められた。

【0043】

(結果3)

被験化合物として Exoenzyme C3 をオレオイル L P A とともに培養液に添加したときの結果を表3に示す。

【0044】

【表3】

	伸展長 (μm)
コントロール	4 5 4
Exoenzyme C3 (2 μg / ml)	
+ オレオイル L P A (0. 0 2 μM)	1 8 5
+ オレオイル L P A (0. 2 μM)	1 8 2
+ オレオイル L P A (2 μM)	1 9 8

(表中のデータは6例の平均値)

【 0 0 4 5 】

表 3 から判るように、R h o 阻害剤である Exoenzyme C3 をオレオイル L P A とともに培養液に添加すると、角膜上皮の伸展はほぼ完全に抑制された。

【 0 0 4 6 】

これらのことから、角膜上皮伸展促進作用は R h o の活性化作用に基づくものであることが確認された。

【 0 0 4 7 】

【発明の効果】

上記の薬理試験から、R h o 活性化作用を有する化合物が優れた角膜上皮伸展促進作用を有し、角膜上皮の創傷治癒促進作用を通じて、種々の要因により角膜が損傷を受けた状態にある角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎またはドライアイ等の角膜障害の治療剤として有用であることが見いだされた。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 R h o 活性化作用を有する化合物の角膜障害に対する作用、特に角膜上皮伸展に対する作用を調べ、R h o 活性化作用を有する化合物を有効成分とする角膜障害治療剤を提供する。

【解決手段】 本発明は、R h o 活性化作用を有する化合物を有効成分とする角膜障害治療剤、たとえば角膜上皮伸展促進剤である。R h o 活性化作用を有する化合物は、たとえばリソホスファチジン酸またはそのアシル誘導体である。角膜障害は、たとえば角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎、ドライアイである。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000177634]

1. 変更年月日 1990年 8月 6日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市東淀川区下新庄3丁目9番19号

氏 名 参天製薬株式会社



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [599009499]

1. 変更年月日 1999年 1月12日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 山口県宇部市大字西岐波396番地の2  
氏 名 西田 輝夫

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**